

Implementación del estudio farmacogenético de hipersensibilidad al abacavir HLA-B*5701 en Argentina

Recibido: 17/02/2014 Aceptado: 31/03/2014

Matias Moragas¹, Juan M Gurevich Messina¹, Paula Aulicino¹,
Debora Mecikovsky², Rosa Bologna², Emiliano Bissio³,
Carlos Falistoco³, Luisa Sen¹, Andrea Mangano¹.

Resumen *Introducción: el abacavir (ABC) es un antirretroviral inhibidor de la transcriptasa reversa del virus HIV-1 que está fuertemente asociado al desarrollo de reacciones de hipersensibilidad en individuos portadores del alelo HLA-B*5701.*

*Objetivos: determinar la prevalencia del alelo HLA-B*5701 en pacientes HIV-1 positivos y en una población control de Argentina.*

*Materiales y métodos: desde enero de 2012 hasta octubre de 2013 se estudiaron 869 pacientes HIV-1 positivos y 63 individuos no infectados con HIV-1. La detección del alelo HLA-B*5701 se realizó mediante un ensayo in house basado en la técnica de PCR en tiempo real, diseñado en nuestro laboratorio y validado según guías internacionales.*

*Resultados: el primero de enero se implementó el estudio farmacogenético para la detección de hipersensibilidad al ABC en los pacientes incluidos en el Programa VIH/sida de la Dirección de SIDA y ETS, y en los niños infectados con HIV-1 del Hospital Garrahan. Para ello se adoptó un protocolo de envío, recepción y procesamiento de las muestras, con un informe detallado de los resultados. El alelo HLA-B*5701 se detectó en 42 individuos infectados con HIV-1 y en 3 individuos no infectados.*

*Conclusiones: la prevalencia del alelo HLA-B*5701 en la población de pacientes infectados con HIV-1 y la población control fue la misma (4,8 %), lo cual sugiere que la presencia de este alelo no influye en la infección por HIV-1. Esta prevalencia fue similar a la reportada para otras poblaciones de origen caucásico.*

Palabras clave: HIV-1, abacavir, hipersensibilidad, test farmacogenético.

¹Laboratorio de Biología Celular y Retrovirus, Hospital de Pediatría "Prof. Dr. Juan P. Garrahan", Ciudad de Buenos Aires.

²Servicio de Infectología, Hospital de Pediatría "Prof. Dr. Juan P. Garrahan", Ciudad de Buenos Aires.

³Dirección de Sida y Enfermedades de Transmisión Sexual, Ministerio de Salud de la Nación, Ciudad de Buenos Aires.

Dirección para correspondencia

DRA. ANDREA MANGANO. COMBATE DE LOS POZOS 1881- Of. 3182.
C1245AAM CABA. ARGENTINA.

andreammangano@gmail.com.

amangano@garrahan.gov.ar

Introducción

El abacavir (ABC) es un potente agente antirretroviral que actúa inhibiendo en forma competitiva a la transcriptasa reversa del HIV-1 y se utiliza en combinación con otras drogas antirretrovirales en el tratamiento de la infección por HIV-1 tanto en adultos como en niños. El efecto adverso más importante asociado al ABC, es una reacción de hipersensibilidad, denominado *Abacavir hypersensitivity syndrome* (ASH), que afecta al 5-8 % de los pacientes que inician tratamiento con dicha droga, y generalmente es observada durante las primeras 6 semanas de tratamiento (1,2). En estos casos, el ABC debe ser suspendido y está contraindicado su reinicio de por vida ya que una nueva reacción puede llegar a ser muy severa y potencialmente fatal. Los estudios de farmacovigilancia han demostrado que la AHS es la principal causa de suspensión del ABC en más del 8 % de los pacientes que inicia tratamiento con esta droga (3). Si bien, los síntomas clínicos asociados al AHS son inespecíficos y difíciles de diferenciar de otras reacciones, se ha descripto una fuerte asociación con el alelo HLA B*5701 (4). La prevalencia del dicho alelo es mayor en poblaciones caucásicas (5-8 %) que en afro-americanos, asiáticos e hispanos (0.26-3,6 %) (5-8).

Actualmente, el test farmacogenético para el HLA B*5701 ha sido incorporado en las guías internacionales y locales de tratamiento antirretroviral para adultos y niños (9-11) para no incluir la administración de ABC en pacientes con test positivos. Además, las agencias regulatorias USA FDA (Food and Drug Administration) y EMEA (European Medicine Agency) han promovido el cambio en el prospecto del ABC, incorporando la recomendación del test de HLA*B5701 antes de iniciar o reiniciar terapia con ABC (12). Este es uno de los primeros ejemplos de farmacogenética aplicada al diagnóstico clínico para prevenir la toxicidad asociada a una droga específica que antes era impredecible.

El objetivo de este estudio fue determinar la prevalencia del alelo HLA-B*5701 en pacientes HIV-1 positivos previo al inicio de tratamiento con ABC y en una población control de Argentina.

Materiales y métodos

Poblaciones de estudio

Se estudiaron 869 pacientes infectados con HIV-1 antes de iniciar tratamiento con ABC desde enero de 2012 hasta Octubre de 2013. De ellos, 798 pacientes no te-

nían cobertura social, procedían de diferentes centros asistenciales del país y estaban incluidos en el Programa VIH/sida de la Dirección de Sida y Enfermedades de Transmisión Sexual del Ministerio de Salud de la Nación. Además, se incluyeron 71 pacientes pediátricos del Hospital de Pediatría "Prof. Juan P. Garrahan". Por otro lado, para estimar la frecuencia del alelo HLA-B*5701 se genotipificaron 63 donantes de sangre (población control).

Procesamiento de las muestras

A partir de hisopados bucales se realizó la extracción de ADN mediante columnas comerciales de extracción QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen). Las muestras de ADN se conservaron a -20°C hasta su utilización. La concentración y pureza del ADN se determinó mediante absorbancia a 260 y 280 nm por espectrofotometría. La cantidad de ADN total utilizada fue de 20-25 ng por reacción.

Genotipificación

La detección del alelo HLA-B*5701 se realizó mediante un ensayo *in house* (13) basado en la técnica de PCR en tiempo real, diseñado en nuestro laboratorio, y validado siguiendo guías internacionales recomendadas por FDA (14). En nuestro ensayo se amplifica una región del gen constitutivo albúmina (control interno de amplificación), y una región del gen HLA-B donde se encuentra el polimorfismo HLA-B*5701. La presencia de los amplicones es detectada a partir de un agente intercalante de ADN presente en la mezcla de reacción. En cada ensayo se incluyen un control positivo (sintetizado en nuestro laboratorio), que replica el comportamiento de una muestra portadora del alelo HLA-B*5701, y un control negativo para su validación.

Análisis estadístico

La diferencia de prevalencia entre grupos se analizó mediante el test de Fischer.

Resultados

A partir del primero de enero de 2012 se implementó para pacientes del Programa HIV/sida y del Hospital Garrahan, un test farmacogenético artesanal desarrollado en nuestro laboratorio para la identificación del alelo HLA-B*5701.

La toma de muestra mediante hisopados bucales permitió su envío por correo postal común. Las muestras se remitían acompañadas de una planilla donde constaba el código del paciente (confidencialidad de la identidad del individuo), centro de derivación, médico solicitante y datos de contacto. Los resultados se remitieron aproximadamente a los 15 días posteriores a la recepción de la muestra vía fax o e-mail. En la figura 1 se detalla el número de prestaciones realizadas por trimestre durante el período de estudio.

Del total de 869 pacientes HIV-1 positivos estudiados, la media de edad fue de 36 años (rango = 0-77) y el 43,7 % eran mujeres. Los pacientes se agruparon de acuerdo a la procedencia en 5 regiones geográficas: NEA (noreste), NOA (noroeste), Centro (Ciudad Autónoma de Buenos Aires -CABA-, Área Metropolitana de Buenos Aires -AMBA-, Córdoba y Santa Fe), Cuyo, y Patagonia. El 87,8 % de las muestras procedió de la región Centro; 7,4 % de Cuyo, 3 % del Norte (NOA + NEA) y 1,7 % de Patagonia. De las muestras de la región Centro, el 64,5 % pertenecían a residentes de CABA, 19,1 % a Córdoba, 13,9 % a AMBA y 2,5 % a Santa Fe. En la población de estudio se detectaron 42 (4,8 %) casos positivos para el alelo HLA-B*5701, de ellos 35 pertenecían a la región Centro, 5 a la región de Cuyo y 2 a la Patagonia (Tabla 1). Dentro de la región Centro, las prevalencias estimadas fueron: 6,2 % en Córdoba; 5,3 % en Santa Fe; 4,7 % en CABA y 1,9 % en AMBA. Sin embargo, el número de casos positivos para Santa Fe y AMBA fueron muy bajos para su comparación estadística. En las regiones del noreste y noroeste no se reportaron casos positivos. La prevalencia del alelo HLA-B*5701 en cada región fue diferente, observándose una mayor prevalencia en la región patagónica (13,3 %), seguido por la de Cuyo (7,8 %) y el Centro (4,6 %), sin alcanzar significancia

Tabla 1. Prevalencia del alelo HLA-B*5701 en pacientes HIV-1 infectados de acuerdo a la procedencia

| Procedencia | HIV-1 Positivos | |
|-------------|-----------------|-------------------------|
| | Nº/Total | Prevalencia % [IC 95 %] |
| NOA | 0/15 | |
| NEA | 0/11 | |
| Cuyo | 5/64 | 7,8 [1,2 - 14,4] |
| Centro | 35/764 | 4,6 [3,1 - 6,1] |
| Córdoba | 9/146 | 6,2 [2,3 - 10,1] |
| Santa Fe | 1/19 | 5,3 [-4,8 - 15,4] |
| CABA | 23/493 | 4,7 [2,8 - 6,6] |
| AMBA | 2/106 | 1,9 [-0,7 - 4,5] |
| Patagónica | 2/15 | 13,3 [4,5 - 31,1] |

estadística. Sin embargo, el número de casos positivos y totales de la región Patagonia fue muy bajo para considerar esta prevalencia como representativa de la región. Además, se estudiaron 63 donantes de sangre de los cuales 3 (4,8 %) fueron portadores del alelo HLA-B*5701. La proporción de individuos portadores del alelo HLA-B*5701 no fue significativamente diferente entre el grupo de pacientes HIV-1 infectados y el grupo control (4,8 %; IC95 %:3,4-6,2 vs 4,8; IC 95 %-0,5-10,1; P = 1,0).

Discusión

En un periodo de 22 meses se realizó el test farmacogenético para predecir la hipersensibilidad al ABC a pacientes pediátricos del Hospital Garrahan y a pacientes pediátricos y adultos incluidos en el Programa HIV/sida. También se estudiaron individuos HIV-1 negativos con el objeto de estimar la prevalencia del alelo HLA-B*5701 en la población.

La distribución del alelo HLA-B*5701 en la población de pacientes infectados con HIV-1 y la población control fue similar (4,8 %). Sin embargo, debido al bajo número de donantes (grupo control), su intervalo de confianza fue muy amplio para confirmar la igualdad entre la prevalencia de este grupo y el grupo de pacientes HIV-1 infectados. Por otra parte, el alelo HLA-B*5701 no se ha asociado con diferen-

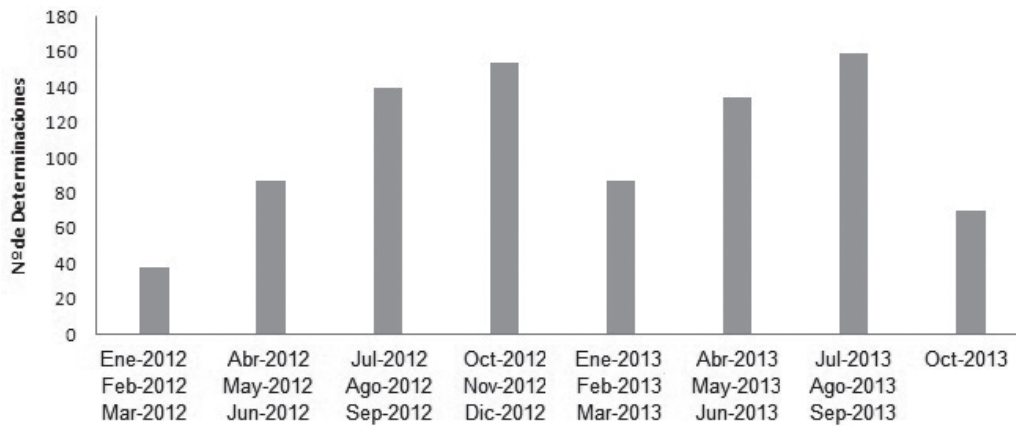


Figura 1. Número de prestaciones realizadas por trimestre en el marco del Programa HIV/sida.

cias en la susceptibilidad a la infección por HIV-1. Por lo tanto, agrupando la población de pacientes infectados y el grupo control como un grupo general de la población Argentina ($n = 932$), la prevalencia de este alelo (4.8 %) fue similar a la reportada en el estudio PREDICT-1 para las poblaciones de origen caucásicas-europeas (~6 %) (6), y en otros reportes de Brasil (3,1 %) (15) y Chile (3,7 %) (16). Si bien, se observaron diferencias en la prevalencia de dicho alelo entre las diferentes regiones de nuestro país no alcanzaron significancia estadística. Esto pueda deberse al escaso número de individuos procedentes de las regiones Patagonia y Cuyo respecto al Centro.

El test utilizado para la detección del alelo HLA-B*5701 desarrollado en el Laboratorio de Biología Celular y Retrovirus presentó una elevada sensibilidad (datos no mostrados), requiriendo una menor cantidad de ADN (20-25 ng) respecto a los kits comerciales disponibles HLA B*57:01, Olerup SSP® (450-900 ng); HLA B*5701 Real-TM®, Sacace Biotechnologies (200-2000 ng). Esto permitió la incorporación del hisopado bucal como fuente de extracción de ADN, simplificando el proceso de la toma de muestra, la cual puede realizarse en el consultorio médico. Es un método menos invasivo que la extracción

de sangre. Además, la muestra se envía en un sobre de papel mediante correo común, siendo esto más económico, ya que no es necesario equipamiento de conservación-contención para muestras biológicas e infecciosas de elevado costo. Otra ventaja del test es que la muestra no requiere ser enviada el mismo día de la toma. Estas ventajas permitieron llevar a cabo sin inconvenientes y con una buena dinámica la prestación del estudio a diferentes centros asistenciales del país en el marco del Programa del Ministerio de Salud de la Nación. Por otro lado, se evitó la extracción de sangre en pacientes pediátricos, que generalmente son sometidos a estudios de rutina donde si se precisa de dicha muestra.

La identificación del alelo HLA-B*5701 en un 4,8 % de los pacientes HIV-1 positivos previo al inicio del tratamiento con ABC destaca la importancia de la incorporación del test farmacogenético. Esto evitó la indicación de ABC en 42 pacientes, resguardando a los mismos de posibles reacciones de hipersensibilidad, mejorando su calidad de vida y disminuyendo los costos asociados al tratamiento de dichas reacciones adversas. Es por esto que apoyamos fuertemente el testeo preventivo del alelo HLA-B*5701 en la práctica médica en el contexto de la terapia con ABC.

Referencias

1. Hetherington S, McGuirk S, Powell G, Cutrell A, Naderer O, Spreen B, et al. Hypersensitivity reactions during therapy with the nucleoside reverse transcriptase inhibitor abacavir. *Clin. Ther.* 2001; 23: 1603-1614.
2. Cutrell AG, Hernandez JE, Fleming JW, Edwards MT, Moore MA, Brothers CH, et al. Updated clinical risk factor analysis of suspected hypersensitivity reactions to abacavir. *Ann. Pharmacother.* 2004; 38: 2171-2172.
3. Peyriere H, Guillemin V, Lotthe A, Baillat V, Fabre J, Favier C, et al. Reasons for early abacavir discontinuation in HIV-infected patients. *Ann Pharmacother* 2003; 37: 1392-7.
4. Hetherington S, Hughes AR, Mosteller M, Shortino D, Baker KL, Spreen W, et al. Genetic variations in HLA-B region and hypersensitivity reactions to abacavir. *Lancet.* 2002; 359 (9312): 1121-1122.
5. Hughes CA, Foisy MM, Dewhurst N, Higgins N, Robinson L, Kelly DV, et al. Abacavir hypersensitivity reaction: an update. *Ann Pharmacother.* 2008; 42: 387-396.
6. Mallal S, Phillips E, Carosi G, Molina JM, Workman C, Tomazic J, et al. HLA-B*5701 Screening for Hypersensitivity to Abacavir. *N. Engl. J. Med.* 2008; 358(6): 568-579.
7. Orkin C, Wang J, Bergin C, Molina JM, Lazzarin A, Cavassini M, et al. An epidemiological study to determine the prevalence of the HLA-B*5701 allele among HIV-positive patients in Europe. *Pharmacogenet. Genomics.* 2010; 20: 307-314.
8. Faruki H, Heine U, Brown T, Koester R, Lai-Goldman M. HLA-B*5701 clinical testing: early experience in the United States. *Pharmacogenet. Genomics.* 2007; 17: 857-860.
9. Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents. Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1-infected adults and adolescents. <http://aidsinfo.nih.gov/ContentFiles/AdultandAdolescentGL.pdf>.
10. Panel on Antiretroviral Therapy and Medical Management of HIV-Infected Children. Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in Pediatric HIV infection. <http://aidsinfo.nih.gov/contentfiles/lvguidelines/pediatricguidelines.pdf>.

11. Recomendaciones para el seguimiento y tratamiento de la Infección por HIV/ SIDA y sus comorbilidades asociadas. SADI 2012. <http://www.sadi.org.ar>
12. Information for Healthcare Professionals: Abacavir (marketed as Ziagen) and Abacavir-Containing Medications. <http://www.fda.gov/Drugs/ResourcesForYou/Consumers/ucm123927.htm>
13. Moragas M, autor. Desarrollo de un ensayo farmacogenético para detección de hipersensibilidad al abacavir. Dirección Nacional del Derecho de Autor 5095952. 14 de mayo de 2013.
14. Eileen M. Burd. Validation of Laboratory-Developed Molecular Assays for Infectious Diseases. Clin Microbiol Rev. 2010; 23(3): 550–576.
15. Crovella S, Biller L, Santos S, Salustiano A, Brandao L, Guimaraes R, et al. Frequency of HLA B*5701 allele carriers in abacavir treated-HIV infected patients and controls from northeastern Brazil. Clinics (Sao Paulo). 2011; 66(8): 1485-1488.
16. Poggi H, Vera A, Lagos M, Solari S, Rodríguez PL, Pérez CM. HLAB*5701 frequency in Chilean HIV-infected patients and in general population. Braz. J. Infect. Dis. 2010; 14(5): 510-512.5. Stoner PB. Current controversies in the management of adult syphilis. Clin Infect Dis 2007; 44 (Suppl 3): S130-S146.

Implementation of pharmacogenetic study HLA-B*5701 to predict abacavir hypersensitivity in Argentina

Summary Introduction: Abacavir is a strong antiretroviral drug that competitively inhibits the reverse transcriptase of HIV-1 and it is associated with an hypersensitivity reaction in HLA-B*5701 carriers. Objectives: Determine the prevalence of HLA-B*5701 allele in HIV-1 infected and non infected subjects of Argentina.

Material and methods: From January 2012 until October 2013 we studied 869 HIV-1 positive patients and 63 non HIV-1 infected subjects. HLA-B*5701 allele detection was performed using an in house assay based on real time PCR, it was designed in our laboratory and it was validated according to international guidelines.

Results: We implemented the pharmacogenetic study to detect ABC hypersensitivity in patients included in the HIV/AIDS Program of AIDS and STD Direction, and in HIV-1 positive children of the Garrahan Hospital. We made a protocol for shipping, reception and processing the samples with a detailed report of the results.

HLA-B*5701 allele was detected in 42 HIV-1 infected patients and in 3 non infected subjects.

Conclusions: The prevalence of HLA-B*5701 allele in HIV-1 infected patients and in control population was 4,8%, it was similar to other reports for Caucasian population. This suggests that the prevalence of this allele not affect the HIV-1 infection. Furthermore, our results supports the preventive screening of HLA B*5701 in ABC treatment in Argentina.

Key words: HIV-1, abacavir, hypersensitivity, pharmacogenetic test.